

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Hiroaki NISHIUCHI, et al.

GAU:

SERIAL NO: New Application

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: METHOD FOR MANUFACTURE OF HIGHLY CYSTEINE-CONTAINING FOOD MATERIAL

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e):
Application No. Date Filed
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

COUNTRY
Japan

APPLICATION NUMBER
2003-062660

MONTH/DAY/YEAR
March 10, 2003

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)
☐ are submitted herewith
☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon

Registration No. 24,618

Customer Number

22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)

Vincent K. Shier, Ph.D.
Registration No. 50,552

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 1 0 日
Date of Application:

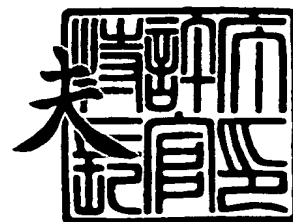
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 6 2 6 6 0
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 6 2 6 6 0]

出 願 人 味の素株式会社
Applicant(s):

2 0 0 4 年 1 月 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康



【書類名】 特許願

【整理番号】 MA43940

【提出日】 平成15年 3月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

【氏名】 西内 博章

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

【氏名】 西森 友希

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

【氏名】 西村 康史

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100064687

【弁理士】

【氏名又は名称】 霜越 正夫

【電話番号】 03-5205-2384

【選任した代理人】

【識別番号】 100102668

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

【電話番号】 03-5205-2521

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 049401

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9607453

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 システイン高含有食品素材の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 γ -グルタミルシステインを 1 重量%以上含有する酵母菌体から酵母エキスを調製し、同エキスを 60℃以下の低温に制御しながら濃縮して固形分濃度 10%以上の液体の形態の食品素材を調製し、該食品素材を 70～130℃に保持することを特徴とするシステイン高含有食品素材の製造法。

【請求項 2】 該食品素材中の還元糖の存在量が 1%以下でかつ酸性条件下で加熱処理（70～130℃に保持）することを特徴とする請求項 1 記載のシステイン高含有食品素材の製造法。

【請求項 3】 該低温制御濃縮方法が真空濃縮であることを特徴とする請求項 1 または 2 記載のシステイン高含有食品素材の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、 γ -グルタミルシステインを 1 重量%以上含有する酵母菌体から酵母エキスを調製し、同エキスを 60℃以下の低温に制御しながら濃縮して固形分濃度 10%以上の液体の形態の食品素材を調製し、該素材を 70～130℃に保持することを特徴とするシステイン高含有食品素材の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

【特許文献 1】 国際公開 WO00/30474 号公報

【特許文献 2】 特許第 2830415 号公報

【特許文献 3】 特許第 2903659 号公報

【特許文献 4】 国際公開 WO01/90310 号公報

システイン及びその酸化型ジスルフィドであるシスチンは食品の風味改善目的で使用されている。特開平 10-136883 号公報には、システイン及びシスチンを含有する電解液に食品を浸漬し、食品の褐変を抑制する方法が開示されている。この発明によると、シスチンが還元極においてシステインに還元され、こ

のシステインにより酵素的酸化によるキノン類の生成を経た褐色色素の生成が抑制されると開示されている。即ち、シスチンを用いてこのような食品の変色を抑制する為には還元によりシステインを生成させるという煩雑な操作が必要となる。また、特許第 3 2 4 6 0 6 4 号公報には、魚節の製造の際にシステインを利用する技術が開示されている。この発明によると、原料魚から節を製造する際に含硫化合物を添加して製造した魚節は、風味が強化されかつ風味劣化が抑制されると記載されており、シスチンよりもシステインの方が重量あたりの効果が高いと記載されている。また、国際公開 WO 9 3 / 0 8 2 7 4 号公報には、動植物蛋白質に含まれる酸化型システイン残基を還元して得られるシスチン残基をパン生地の改良に用いる技術が開示されている。このように、システインはその酸化型であるシスチンよりも使用範囲が広く、使用効果が高い。

【 0 0 0 3 】

このように広い用途を有するシステインの製法としては、蛋白分解法や半合成法などが知られているが、現在主に用いられている方法は蛋白分解法と半合成法である。しかしながら、システインを上記の目的で用いる場合、これを高含有量で含有する食品素材の強い要望があるが、システインを高含有量で含有する食品素材は従来ほとんど知られていなかった。

【 0 0 0 4 】

しかるところ、最近、国際公開 WO 0 0 / 3 0 4 7 4 号公報（特許文献 1）にて、 γ -グルタミルシステイン（以下、 γ -GC と表記することがある）を含む食品素材を酵素処理又は特定条件下での加熱処理に付することによりシステイン及びその酸化型ジスルフィドであるシスチンを高含有する食品素材が得られることが明らかとなった。しかしながら、特許文献 1 には、 γ -GC からシステイン（Cysteine。以下、Cys と表記することがある）及び酸化型ジスルフィドであるシスチン（Cystine）の合計生成率は記載されているが、 γ -GC からシステイン単独の生成率は記載されていない。前述したように、システインはシスチンよりもその用途が広く、その効果も高いことがわかっており、システインを効率的に製造する方法は産業上有益である。また、酵素処理によりシステイン及び酸化型ジスルフィドであるシスチンを製造するためには酵素が必要であり、加熱処

理によりシステイン及びその酸化型ジスルフィドであるシスチンを製造するよりもコスト高になる。

【 0 0 0 5 】

このような状況のもと、 γ -G C より加熱処理によりシステインを効率的に製造する改良方法が強く望まれていた。

【 0 0 0 6 】

γ -G C を加熱処理するプロセスは、前掲特許文献 1 の他に、特許第 2 8 3 0 4 1 5 号公報（特許文献 2）、特許第 2 9 0 3 6 5 9 号公報（特許文献 3）等でも公開されている。特許文献 2 では、 γ -G C に糖類を添加して加熱することにより良好なローストミート様の香りや風味がするフレーバー組成物が得られると開示されおり、そして特許文献 3 ではグルタミルシステイン等の含硫化合物を一定量含有する酵母エキスを糖類を添加し、脂肪非存在下で加熱することによりローストミートフレーバー様風味を有する調味料が得られると開示されている。しかしながら、これら 2 つの特許文献 2 および 3 でもやはり、 γ -G C から効率的にシステインが得られるとの知見は開示されていない。

【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】

前項記載の従来技術の背景下に、本発明の目的は、 γ -C G から効率的にシステインを得ることができる方法、延いては酵母エキスからシステイン高含有食品素材の優れた製造法を提供することにある。

【 0 0 0 8 】

【課題を解決するための手段】

ところで、特許文献 1 では、 γ -G C を加熱することにより、前述のように、システイン及びその酸化型ジスルフィドであるシスチンの総量が高収率で得られると開示されている。

【 0 0 0 9 】

さて、本発明者は、 γ -G C の加熱による反応が分子内反応により進行することを実験により確認した（後掲実験例 1 参照）。その為、加熱分解により γ -G C から遊離するシステイン及びその酸化型ジスルフィドの収率は、 γ -G C の濃

度によらない為、 γ -G C を含有する水溶液を濃縮する必要はない。一方、酵母エキスには含硫化合物が豊富に含まれており、 γ -G C と相互作用する（後掲実験例 2 参照）。その為、酵母エキス等の含硫化合物が含まれている食品素材の溶液中で γ -G C を加熱分解する場合は、2 分子以上の反応に特徴的な分子間反応が生じることが想定される。よって、 γ -G C を酵母エキス等の食品素材の溶液中で加熱分解するプロセスは、分子間反応と分子内反応が競合する反応機構を示す。このような、分子間反応と分子内反応が競合する場合には、反応溶液の反応物質（reactant）濃度を低くすることにより分子間反応を抑制できる。一方、分子内反応自体は基質濃度に依存しない為、反応溶液の反応物質濃度を低くしても反応速度に影響しない。その為、反応溶液中の反応物質濃度を低くすることにより、分子間反応が抑制される為に、相対的に分子内反応の効率が上昇する。

【 0 0 1 0 】

このような、分子間反応と分子内反応が競合するような反応例として、ペプチドの環化反応をあげることができる。環状ペプチドを合成する場合は、分子内環化（分子内反応）を優先させる為、高希釈化又は溶液中に反応物の溶液を滴下しながら反応させることにより、反応溶液中の反応物質濃度を低くし、環状ペプチドを高収率で合成する。

【 0 0 1 1 】

このような理論的背景の下、 γ -G C を酵母エキスなどの食品素材溶液中で加熱分解する場合は、食品素材溶液の固形分濃度が低い条件下で反応を行なうことが γ -G C からシステイン及びその酸化型ジスルフィドであるシスチンの生成率を高めることに資する。特許文献 1 においても、 γ -G C を 4 . 5 % 含有する酵母エキス粉末を固形分濃度が 2 % 水溶液になるように溶解して加熱分解したところ、システインおよびその酸化型ジスルフィドであるシスチンを総量で 2 % 含有する酵母エキス粉末が得られたと記載されている（同文献実施例 1 参照）。この時の γ -G C からシステイン及びその酸化型ジスルフィドであるシスチンの生成率は 9 0 % 以上であり、前述の理論通り極めて高い生成率を示している。

【 0 0 1 2 】

システインはシスチンに比較して、前述のように用途が広くその使用効果も高

いことから、同文献記載の条件下でのシステインの生成率（システインへの変換率）を確認することが必要である。そこで、本発明者らは、同文献記載の実施例 1 に準じ、 γ -GC を含有する酵母エキスを固形分濃度 2 % の水溶液に調製し、同様の条件で加熱処理を行いシステインへの変換率（すなわち、加熱処理した水溶液中のシステインのモル数を加熱処理前の水溶液中の γ -GC のモル数で除した商）を求めたところ、 γ -GC からシステインへの変換率は約 40 % であった。

【0013】

本発明者らは、 γ -GC からシステインへの変換率を高めるために鋭意検討を行なった結果、 γ -GC を含有する酵母エキスを 60℃ 以下の低温に制御しながら濃縮して固形分濃度 10 % 以上の濃縮物となし、好ましくは酸性条件下、より好ましくは pH 3.5～6、かつ好ましくは還元糖の存在量が 0.5 % 以下の水溶液状態で前記濃縮温度より高温の 70～130℃ に保持する加熱処理に付することにより γ -GC からシステインへの変換率を 70 % にも高めることができることを見出し、このような知見に基いて本発明を完成するに到った。この結果は、分子内反応と分子間反応が競合する γ -GC の水溶液中での分解反応からは推定される結果とは異なる予想外のものである。

【0014】

すなわち、本発明は、酵母菌体を処理して得られる酵母エキスを 60℃ 以下の低温に制御しながら濃縮し、固形分濃度 10 % 以上の濃縮物となし、これを好ましくは酸性条件下、より好ましくは pH 3.5～6 でかつ好ましくは還元糖の低存在量、具体的には、好ましくは 1 % 以下、より好ましくは 0.5 % 以下、の条件下で前記濃縮温度より高温の 70～130℃、好ましくは 70～100℃、より好ましくは 75～100℃ に保持すること（加熱処理）により、 γ -GC を含有する酵母エキスを高含有する食品素材を効率的に製造する方法に関するものである。

【0015】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0016】

先ず、(1) γ -GC を 1 重量%以上含有する酵母は、次のようにして入手することができる。

【0017】

すなわち、本発明に用いる酵母は、 γ -GC を 1 重量%以上含有する酵母であれば、特に制限されない。このような酵母は、国際公開WO00/30474号公報（前掲特許文献1）に記載されているH4 Δ GSH2株、国際公開WO01/90310号公報（特許文献4）に記載のN α 2株、N α 3株などを挙げるることができる。後述するように、 γ -GC は分解反応時に酵母エキスのSH基を有する化合物と相互作用してシステインの生成率が低下する為、菌体中のグルタチオン含量が低下した酵母、好ましくは乾燥酵母菌体あたり0.5%以下、より好ましくは0.1%以下、さらに好ましくは菌体の生育とのバランスからグルタチオンを微量しか含有していない菌株を用いることが好ましい。このような菌株として、例えば、387位のグリシン残基がアルパラギン酸残基に変異したグルタチオン合成酵素を有するサッカロマイセス・セレビシエ、54位のプロリン残基がロイシン残基に変異したグルタチオン合成酵素を有するサッカロマイセス・セレビシエ、370位のアルギニン残基以降が欠失したグルタチオン合成酵素を有するサッカロマイセス・セレビシエなどをあげることができる。

【0018】

酵母は、前記のように、 γ -GC を 1 重量%以上含有するものであれば特に制限されないが、具体的にはサッカロマイセス・セレビシエなどのサッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス・ポンベなどのシゾサッカロマイセス属、キャンディダ・ユティリスなどのキャンディダ属等に属する酵母を挙げるることができる。因みに、後掲実施例1においては、国際公開WO01/90310号公報（前掲特許文献4）に記載の手法を利用して取得したグルタチオン合成酵素活性が弱化した2倍体酵母（サッカロマイセス・セレビシエ）N3株を用いた。

【0019】

次に、(2) 上のように準備した酵母から酵母エキスを製造する方法を説明する。

【 0 0 2 0 】

上記のようにして得られる種酵母を好適な条件で培養して得られた酵母培養物は、所定量の γ -G C を含有する酵母菌体を含有する。培養物からそのまま酵母エキスを製造することもできるが、酵母培養物から γ -G C を含有する酵母菌体を一旦分離し、この菌体から酵母エキスを製造することもできることは言うまでもない。酵母エキスの製法は、その条件は γ -G C 又は C y s を著しく分解しない限り特に制限されず、常法によることができる。1 例として、酵母菌体を 6 0 ~ 8 0 °C の熱水で保持することにより内容物を抽出し、抽出残渣（菌体残渣）を取り除くことにより製造する方法を挙げることができる。このような熱水抽出法で酵母エキスを製造した場合、酵母エキスの固形分濃度は通常数%程度である。また、熱水抽出により酵母エキスを製造した場合、菌体残渣が取り除かれる為酵母エキに含まれる固形分あたりの γ -G C 含有量は数倍に上昇する。例えば、1 重量%の γ -G C を含有する酵母菌体から熱水抽出により内容物を抽出した場合、酵母エキに含まれる固形分あたりの γ -G C 含有量は約 4 ~ 8 重量%程度に上昇する。なお、抽出効率は劣るが、酵母菌体や酵母培養物から酵母エキスを製造する際、抽出温度を 6 0 °C 以下の低温に保持する方法も本発明の実施態様から排除されるものではない。この場合、次工程である濃縮工程にそのまま連続するため、抽出物である酵母エキスが固形分濃度 1 0 % 以上になるまで 6 0 °C 以下に連続保持することになる。

【 0 0 2 1 】

(3) 上のようにして得られた酵母エキスの本発明の方法による濃縮方法は、次の通りである。

【 0 0 2 2 】

すなわち、上記のようにして製造した酵母エキスは固形分濃度が通常数%の低濃度であるので、 γ -G C を C y s へ変換する加熱処理前に濃縮する必要がある。濃縮方法は、 γ -G C 及び C y s を著しく分解しない限り特に制限されないが、低温濃縮であることが好ましい。高温条件下での濃縮は、 γ -G C 及び C y s が酵母エキス中の含硫化合物と相互作用し、C y s の生成率が低下する為好ましくない。

【 0 0 2 3 】

かくして、本発明においては、酵母エキスを 6 0 ℃以下の低温に制御しながら濃縮して固形分濃度 1 0 %以上の液体の形態の食品素材を調製する。低温濃縮法としては、具体的には、真空濃縮、冷凍濃縮などが挙げられる。また、濃縮は、低溶存酸素共存下、例えば溶存酸素量 3 p p m以下、好ましくは 2 p p m以下、より好ましくは 1 p p m以下で行うことが好ましい。溶存酸素共存下での濃縮は、 γ -G C及びC y sのS H基が酸化を受け、C y sの生成率が低下する為好ましくない。このような条件下での低温濃縮によれば、酵母エキスの固形分濃度は例えば 6 ~ 1 5 時間で固形分濃度 1 0 %以上になる。この場合、例えば、酵母エキスを固体状となるまで濃縮することも可能であるが、固体状とした場合、次工程である濃縮後の加熱反応は、固体状としたものを水等によって液体状に戻す必要がある。従って、濃縮後の酵母エキスは、液体状であることが工程管理上からも望ましい。

【 0 0 2 4 】

次に、(4) 上のようにして得られた液体形態の食品素材を加熱処理してシステイン高含有食品素材とする方法を説明する。

【 0 0 2 5 】

濃縮後の酵母エキスの加熱反応（加熱分解）は固形分濃度 1 0 %以上の液体の形態の食品素材（水溶液）中に行なうことが好ましい。固形分濃度 1 0 %未満の水溶液中で加熱分解を行なった場合、 γ -G Cの分解反応が1次反応に従わず、C y sへの分解以外の副反応が生じ、C y sの生成率が低下するため好ましくない。また、加熱温度は 7 0 ~ 1 3 0 ℃の間で行なうことが、C y sの効率的生成にとって好ましい。7 0 ℃未満で加熱反応を行なった場合、 γ -G CからC y sへの分解反応に時間がかかり、その間に γ -G C及びC y sのS H基が溶液中の溶存酸素によって酸化を受けるため好ましくない。一方、1 3 0 ℃より高温で分解反応を行なう場合、 γ -G C及びC y sのS H基が酸化を受けC y sの生成率が低下するため、同様に好ましくない。このような条件下での加熱処理によれば、該食品素材は、例えば 3 0 分から 1 2 0 分でC y sを固形分濃度に占める割合で 2 %もの高含有率で含有するC y s高含有食品素材となる。

【0026】

(a) なお、液体の形態の食品素材の、前項(4)で説明した加熱処理の際の還元糖の存在量については、次の通りである。

【0027】

γ -GCの加熱分解中には還元糖は存在しないことが好ましい。具体的には、先に説明したように、好ましくは1%以下、さらに好ましくは0.5%以下である。還元糖が存在すると、これが γ -GC及びCysと反応し、Cys以外の物質に変換されてしまうからである。還元糖の存在量はCysへの変換率に影響するため極力存在しないことが好ましい。このような還元糖の存在量が上記の範囲内にある食品素材は、酵母の培養時に残糖が可及的少量となるように糖を酵母に資化させた酵母培養物から調製することができる。また、残糖が多い場合は、酵母培養物からそのまま酵母エキスを製造しないで酵母培養物から酵母菌体を一旦分離し、また必要に応じて一旦分離した酵母菌体を水洗するなどしてから酵母エキスを作成することで調製することができる。 γ -GCからCysへの加熱反応(加熱分解)時に還元糖が存在する場合は、モル当量などから考えて、還元糖の存在量は好ましくは1%以下、さらに好ましくは0.5%以下であり、かつ酸性条件下、好ましくはpH3.5~6で γ -GCからCysへの変換反応を行なうことが好ましい。

【0028】

(b) また、加熱反応時のpHについては次の通りである。

【0029】

加熱による γ -GCからCysへの変換工程は後述実験例1に記載のように、 γ -GCのカルボニル基の酸素原子の部位にプロトネーションが生じる結果、この部位を起点とした脱離反応が生じることにより起きる。その為、酸性条件下で行なうことが好ましい。例えば、十分なプロトネーションが生じるpH3.5~6とすることができる。

【0030】

【実施例】

以下、実験例および実施例により本発明を更に詳細に説明する。

【 0 0 3 1 】

実験例 1 : γ -G C からシステインの遊離反応は分子内反応によることの確認

まず、M O P A C (Cambridge Soft ChemOffice Ultra, CS MOPAC) を用いた γ -G C の構造最適化計算を行なったところ、 γ -G C の分子構造は通常の α 結合をしたジペプチドでみられるような伸びた構造ではなく、 γ -グルタミル基がシステイン(C y s)のアミノ基に接近するように曲がった構造をとることが予測された。また、 γ -G C の分極電荷を計算したところ、 γ 位のカルボニル基の酸素原子の部位に負の電荷を有していた。その為、酸性条件下では、 γ -G C のこの部位がプロトネーションを起こしやすく、この部位を起点とした脱離反応が起き、C y s が遊離すると予測される。 γ -G C の持つこのような分子構造から、 γ -G C からの C y s の遊離反応 (γ -G C の C y s への分解反応) は分子内反応にて進行すると推測される。

【 0 0 3 2 】

次に、 γ -G C から C y s の遊離反応が分子内反応によって進行し、基質濃度に依存しない事を確認する為、反応速度論による解析を行なった。 γ -G C を約 1 0 m M 及び約 1 0 0 m M 含有する 2 種の水溶液を調製し、各々を 5 0、6 0、7 0 および 8 0 $^{\circ}$ C に加熱し、0 ~ 2 4 時間後の γ -G C 量を測定した。この結果より分解速度定数を求め、アレニウスプロットを作成した。

【 0 0 3 3 】

結果を図 1 A ~ 図 1 D に示す。この結果から、加熱温度が高いほど分解速度は速いことがわかる。このことから、 γ -G C からの C y s の遊離反応は基質濃度依存的ではなく、温度依存的に進行することが示された。

【 0 0 3 4 】

上記の結果より、 γ -G C からの C y s の遊離反応は分子内反応により起こり、 γ -G C の基質濃度に依存しない事が確認された。

【 0 0 3 5 】

実験例 2 : γ -G C と酸化型含硫化合物の相互作用

γ -G C は食品素材中の他の含硫化合物と相互作用する。そこで、酸化型ジスルフィドである酸化型グルタチオン含有溶液中での γ -G C の分解反応を調べた

。その結果、酸化型含硫化合物が共存するような食品素材中では、 γ -GCはその還元力の高さから酸化型含硫化合物を還元し、次に γ -GCを含む化合物の分解反応が進行することが予測される。その反応は後掲図2に示す反応機構により分解することが推測された。

【0036】

そこで、まずCys、 γ -GCおよびグルタチオン（以下、GSHと表記することがある）の還元電位を調べたところ、Cys、 γ -GCそしてGSHの順に還元力が高かった。次に、10mMのGSSG（酸化型グルタチオン）またはGSSG非添加及び10mMの γ -GCを含む水溶液（pH5）を調製し、90℃で加熱し、Cys、 γ -GCおよびGSHの値を経時的に測定した。

【0037】

これらの結果を図3（a）及び図3（b）に示す。それらの結果から、 γ -GCによってGSSGが還元されてGSHが生成し、GS- γ -GCが生成する結果、 γ -GCからのCysの遊離が効率的に生じない事がわかった。即ち、酸化型SHを有する食品素材中で γ -GCを加熱分解するとその濃度依存的に副反応が生じ、システインの生成率が低下することが示された。

【0038】

実験例3： γ -GC含有酵母エキス及び酵母エキス粉末の調製

以下の実験例に用いる γ -GC含有酵母エキス粉末を以下のようにして調製した。

【0039】

（a） γ -GC含有酵母N3株の取得

2倍体サッカロマイセス・セレビシエ野生株から常法に従って、1倍体Na株（MAT_a）を取得した。Na株と国際公開WO 01/9310号公報（前掲特許文献4）記載の1倍体酵母（サッカロマイセス・セレビシエ）N α 3株（MAT _{α} gsh2）を接合させ、2倍体酵母を取得した。この2倍体酵母を常法に従い、孢子形成させ、N α 3株と同じ変異型グルタチオン合成酵素遺伝子を有する1倍体酵母Na3株（MAT_a gsh2）を取得した。N α 3株とNa3株を接合させ取得した2倍体の中から、ホモの形で変異型グルタチオン合成酵

素を有し、SD培地で培養した時対数増殖期に1重量%以上の γ -GCを含有する2倍体酵母N3株を選抜した。なお、N α 3株の代わりにサッカロマイセス・セレビシエ FERM P-18546 (国際寄託番号 BP-8228) を用いることによっても取得することができる。

【0040】

(b) γ -GC含有酵母菌体の調製

上記のようにして取得したN3株をジャーファンメーターを用いて培養した。YPD培地を用い、30℃でグルコースをフィードして培養した。培養物を集菌・洗浄することにより γ -GC含有酵母菌体を調製した。

【0041】

(c) γ -GC含有酵母エキス及び酵母エキス粉末の調製

上記のようにして調製した γ -GC含有酵母菌体を10g/dlの濃度になるように水に懸濁し、70℃で10分間加熱することにより内容物を抽出した。遠心分離により、酵母菌体残渣と内容物を分離した。分離された内容物(酵母エキス。固形分濃度1.7%)を凍結乾燥により乾燥させ、DM(dry matter、固形分)に占める割合が8%の γ -GCを含有する酵母エキス粉末を調製した。

【0042】

実験例4：糖存在下での γ -GCの分解反応(1)

前掲特許文献1および2には、 γ -GCを酵母エキス中で糖類を添加して加熱処理することにより良好なローストビーフ風味のフレーバー組成物が得られることが開示されている。そこで、この反応中のCys生成率を測定した。

【0043】

すなわち、実験例3で調製した酵母エキス粉末を30重量部、グルタミン酸を30重量部およびキシロース(還元糖)を3重量部の割合で含む濃度83%の水溶液を調製し(還元糖の存在量3%)、90℃で35分加熱処理した。その結果、Cysは生成していなかった。これは、生成したCysが糖類と反応した為であると推測される。

【0044】

実験例5：糖存在下での γ -GCの分解反応(2)

実験例 3 で作成した酵母エキスパウダーを濃度 30%、pH 4.5 の水溶液に調製し、この溶液を 10 等分して、それぞれにキシロース又はグルコースを終濃度で 0%、0.25%、0.5%、1% および 3% になるように添加した。各水溶液を 90℃ で 2 時間保持して加熱処理を行った。

【0045】

その結果を後掲図 4 に示す。この結果から、酸性条件下では、キシロース濃度が 1% 以下であるとき効率的に Cys が得られることが示された。

【0046】

実験例 6：酵母エキスパウダー濃縮条件（溶存酸素濃度）

実験例 3 で作成した γ -GC を含む酵母エキスパウダーを濃度 3.4% の水溶液（pH 4.5）に調製し、これを 50℃ で 10 時間加熱した。水溶液中の溶存酸素濃度による γ -GC（生成した Cys も合算する）の残存率を調べた。

【0047】

結果を後掲図 5 に示す。それらの結果から、溶存酸素濃度 1 ppm（脱気及び窒素封入により制御した）では、 γ -GC は 90% 程度も残存しているが、溶存酸素濃度 6 ppm では、40% 程度に低下した。6 ppm は常圧下での溶存酸素濃度であるため、酸化型 SH を作成しないためにも真空条件下で低温加熱処理することの有効性が示された。

【0048】

次に、実験例 3（c）で調製した酵母菌体抽出液（遠心分離により酵母菌体残渣と分離した内容物）を 120 mmHg の減圧下で、抽出液を 50～70℃ の範囲で加熱することにより、固形分濃度が 60% になるまで濃縮した。濃縮途中に、酵母菌体抽出液に含まれる γ -GC 及びシステイン含有量を経時的に測定した。その結果、 γ -GC 及びシステインの総量は 85% 以上残存していた。

【0049】

実験例 7：固形分濃度による γ -GC の分解反応の違い

実験例 3（c）で調製した酵母菌体抽出液（固形分濃度 1.7%）を 120 mmHg の減圧下で温度を 50℃ に制御しながら固形分濃度が 2～60%（すなわち、3%、5%、8%、10%、20% および 30%）になるまで真空濃縮した

。塩酸を添加することにより pH を 4.5 に調整した各水溶液を 50℃、60℃、70℃、80℃ および 90℃ で加熱し、水溶液中の γ -GC 含有量を経時的に測定することにより、各濃度における γ -GC の分解反応を反応速度論により解析した。

【0050】

結果を後掲図 6A～6F に示す。各図において、(a) はある固形分濃度における γ -GC の分解経時変化を示し、(b) は対応するアレニウスプロットを示す。それらの結果から、固形分濃度 10% 以上で加熱処理したときは γ -GC の分解反応は分子間反応より分子内反応が優先し、温度依存的な一次反応にて進行することがわかった。よって、酸化型 SH を有する食品素材中では、濃度 10% 以上で加熱処理することが分子間反応を抑制し、分子内反応を進行させ Cys の生成効率を高めることに効果的であることが示された。

【0051】

実験例 8： γ -GC からの Cys の生成率

実験例 3 (c) で調製した酵母菌体抽出液（固形分濃度 1.7%）を 120 mmHg の減圧下で温度を 50℃ に制御しながら固形分濃度が 10～60%（10%、20%、30%、40%、50% および 60%）になるまで真空濃縮し、塩酸を添加することにより pH を 4.5 になるように調整した。各水溶液を 90℃ で加熱し、Cys の生成率を経時的に測定した。その結果、各々の固形分濃度における Cys の生成率（加熱後の水溶液に含まれる Cys のモル数の最高値を濃縮前の溶液に含まれる γ -GC のモル数で除した商）は順に 72.5%、77.6%、78.7%、78.1%、77.5% および 74% であった。

【0052】

実施例 1：システイン高含有食品素材の調製

(a) 液体のシステイン高含有食品素材の調製

実験例 3 記載の方法で調製した γ -GC 含有酵母菌体を 10 g/dl になるように水に懸濁し、70℃ で 10 分間加熱することにより内容物を抽出した。遠心分離により、酵母菌体残渣と内容物を分離した。このようにして γ -GC を含有する内容物 10 L を調製した（エキス中の固形分濃度は約 1.7% であり、 γ -

G Cは固形分に対し約8%含有されていた)。内容物を120 mmHgの減圧下で温度を50℃に制御して濃縮、約10時間後に固形分濃度約30%まで濃縮した。塩酸を添加しpHを4.5に調整した濃縮液を90℃で約1時間保持し、液体のシステイン高含有食品素材を調製した。すなわち、固形分に占める割合が3.1%のCysを含有する食品素材を得た。この時の γ -G CからCysへの変換率は約80%であった。

【0053】

(b) 粉末のシステイン高含有食品素材の調製

上記で得られた液体のシステイン高含有食品素材を凍結乾燥することにより、固形分に占める割合が3.1%の粉末状のCys高含有食品素材を得た。

【0054】

【発明の効果】

本発明によれば、 γ -G Cから効率的にシステインを得ることができ、延いては酵母エキスからシステイン高含有食品素材を容易に提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1A】

γ -G C (濃度10 mM) の分解反応を示す (実験例1)。

【図1B】

γ -G C (濃度10 mM) の分解反応 (Cysの生成) を示す (実験例1)。

【図1C】

γ -G C (濃度100 mM) の分解反応を示す (実験例1)。

【図1D】

γ -G C (濃度100 mM) の分解反応 (Cysの生成) を示す (実験例1)。

。

【図2】

γ -G Cと酸化型含硫化合物の相互作用のメカニズムを示す (実験例2)。

【図3】

Cys、 γ -G CおよびGSHのGSSG共存下および非共存下の加熱反応を示す (実験例2)。

【図 4】

糖存在下での γ - G C の分解反応 (C y s 変換率) を示す (実験例 5) 。

【図 5】

溶存酸素濃度と γ - G C の残存率の関係を示す (実験例 6) 。

【図 6 A】

DM 3 % における γ - G C の分解反応を示す (実験例 7) 。

【図 6 B】

DM 5 % における γ - G C の分解反応を示す (実験例 7) 。

【図 6 C】

DM 8 % における γ - G C の分解反応を示す (実験例 7) 。

【図 6 D】

DM 1 0 % における γ - G C の分解反応を示す (実験例 7) 。

【図 6 E】

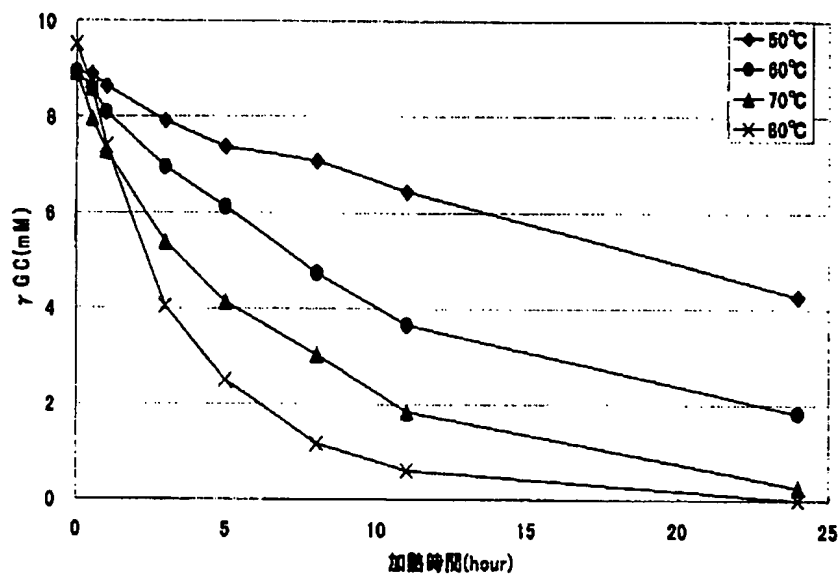
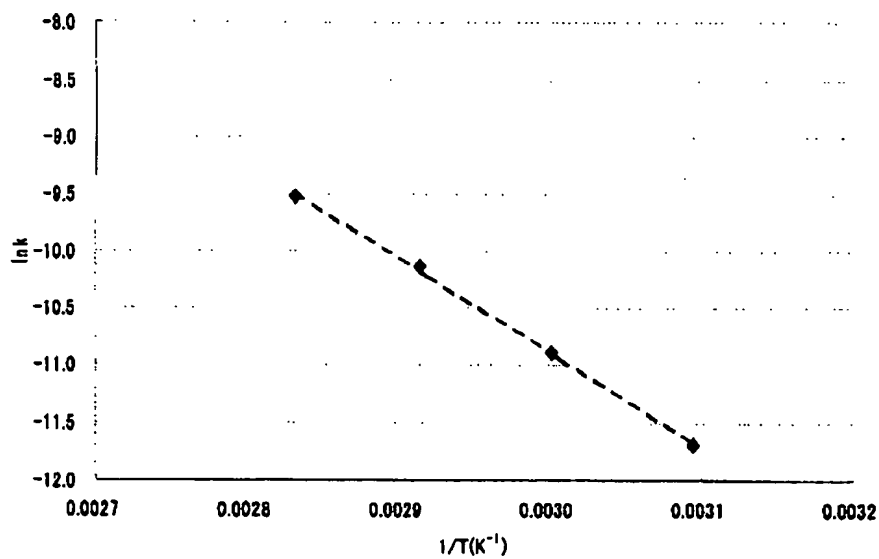
DM 2 0 % における γ - G C の分解反応を示す (実験例 7) 。

【図 6 F】

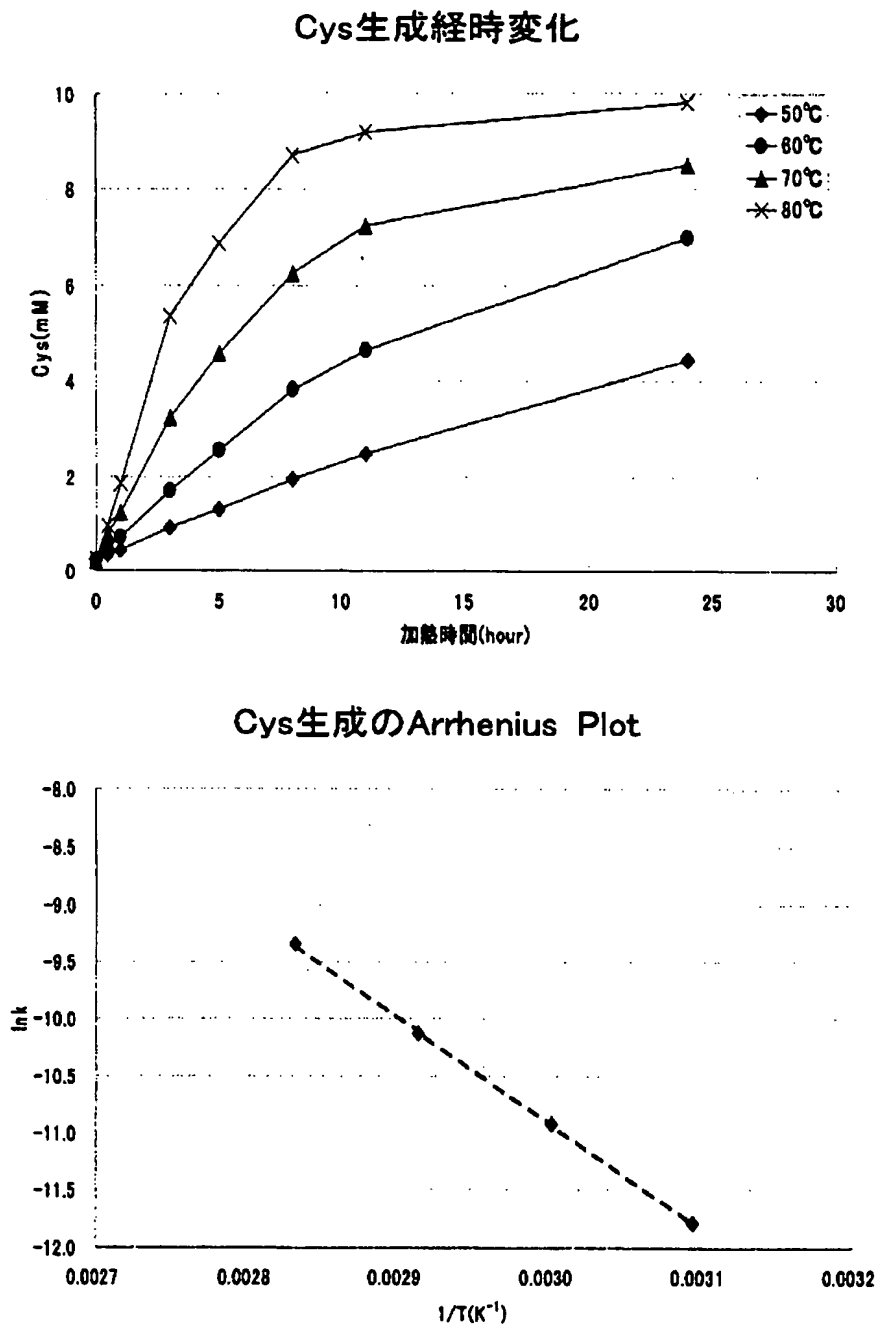
DM 3 0 % における γ - G C の分解反応を示す (実験例 7) 。

【書類名】 図面

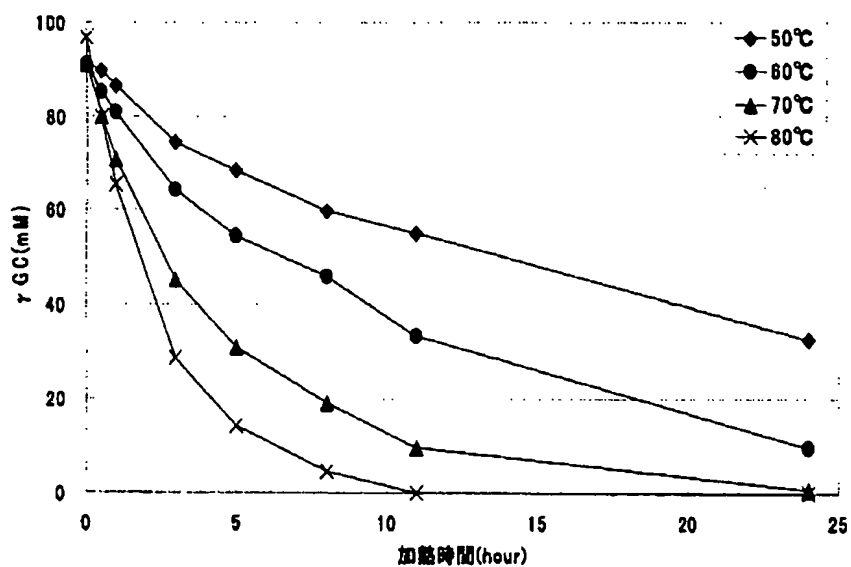
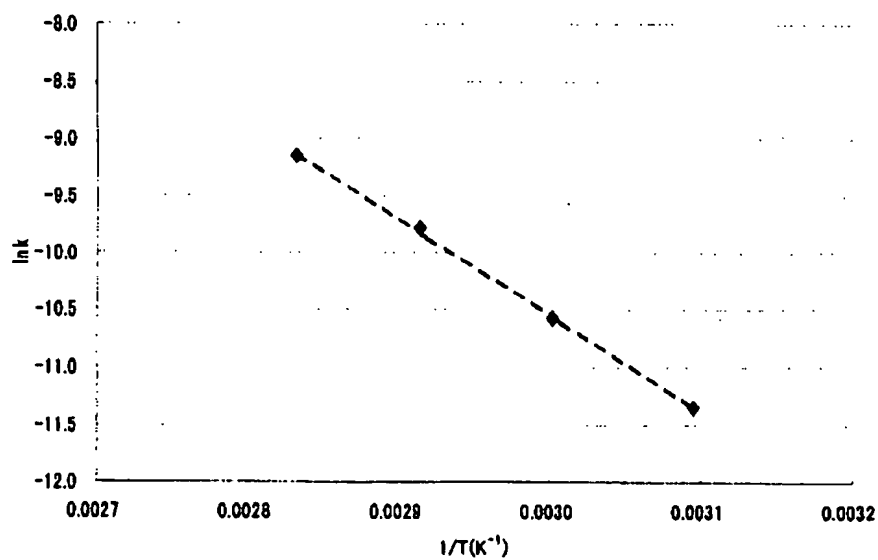
【図 1 A】

図 1A 10mM γ -GCの分解反応 γ -GC分解経時変化 γ -GC分解のArrhenius Plot

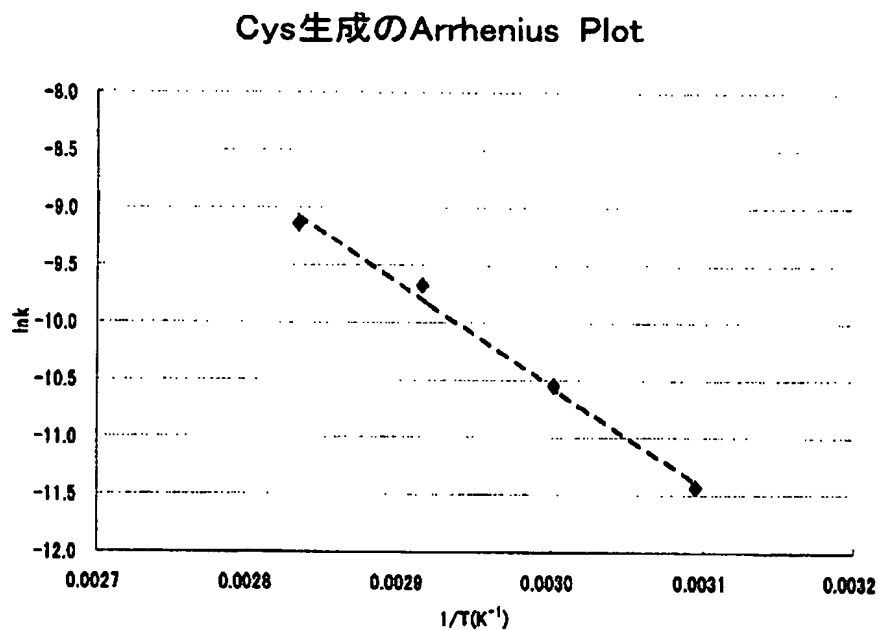
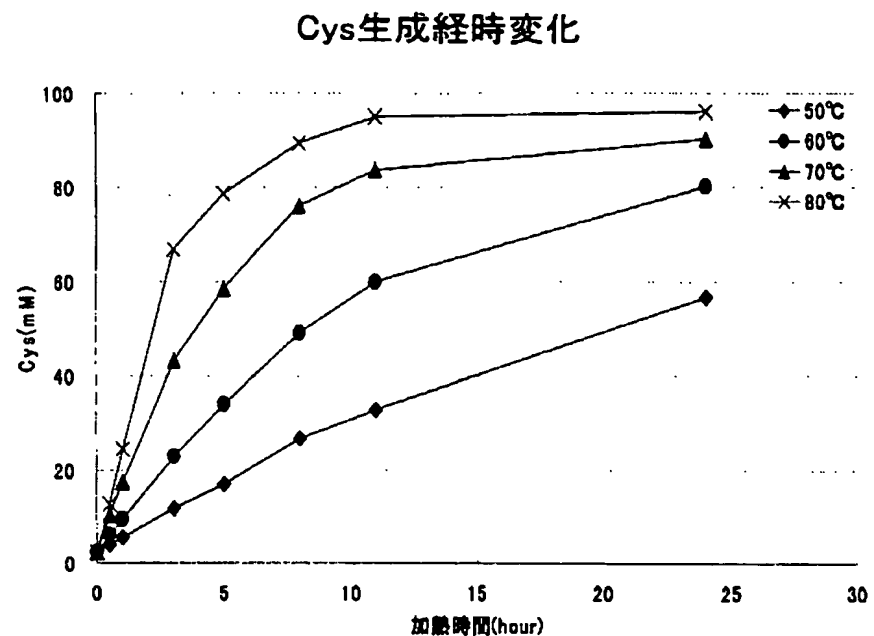
【図1B】

図1B 10mM γ -GCの分解反応(Cysの生成)

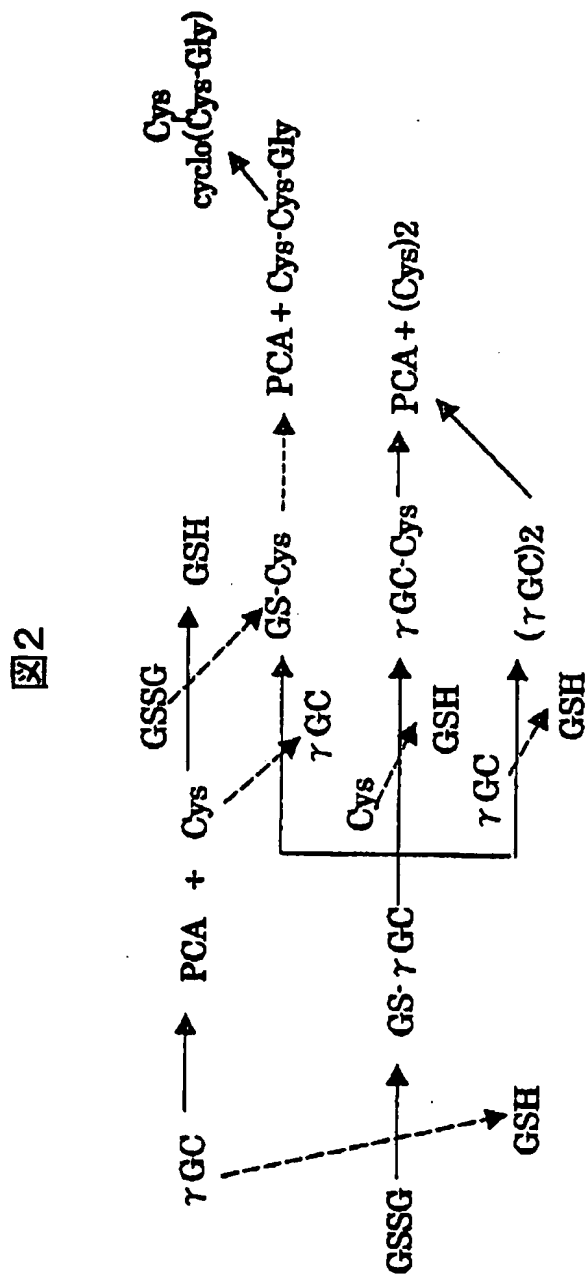
【図 1 C】

図1C 100mM γ -GCの分解反応 γ -GC分解経時変化 γ -GC分解のArrhenius Plot

【図1D】

図1D 100mM γ -GCの分解反応(Cysの生成)

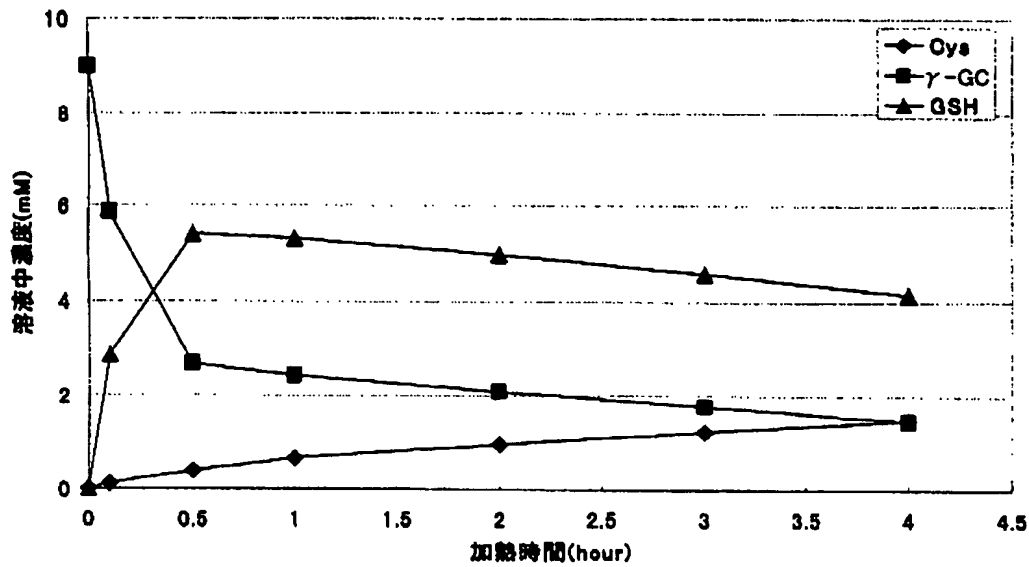
【図 2】



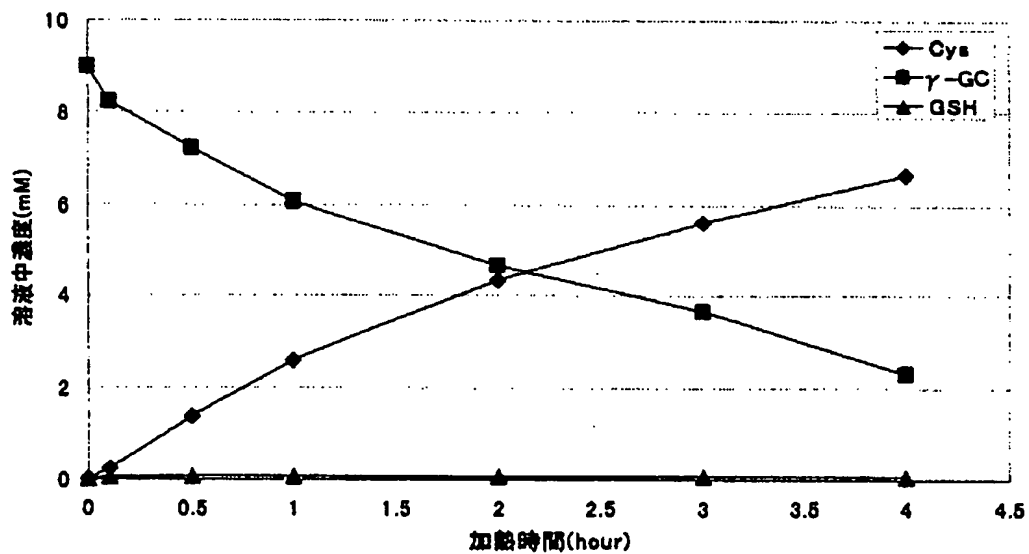
【図3】

図3 GSSG共存下および非共存下の加熱反応

(a) 10mMGSSG共存下の加熱反応

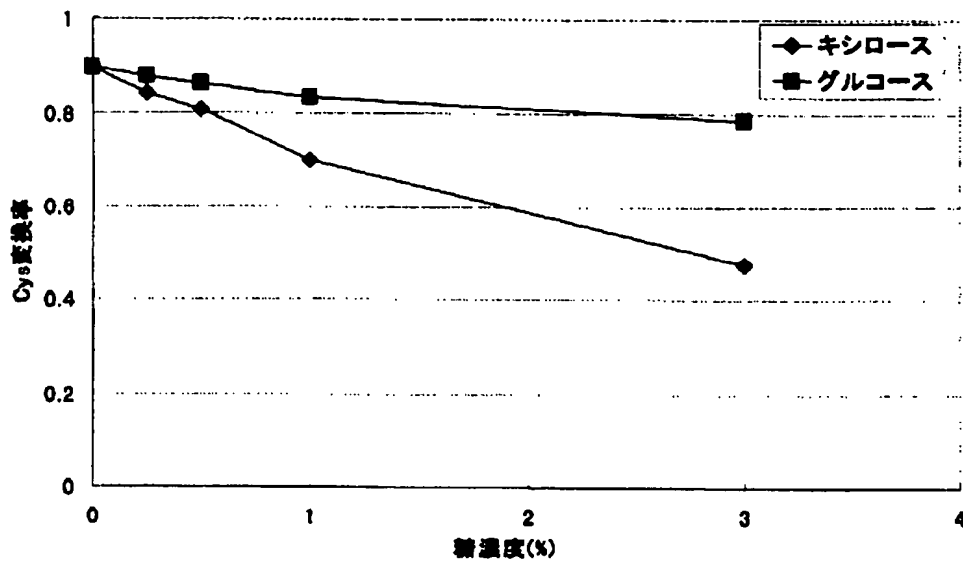


(b) GSSG非共存下の加熱反応

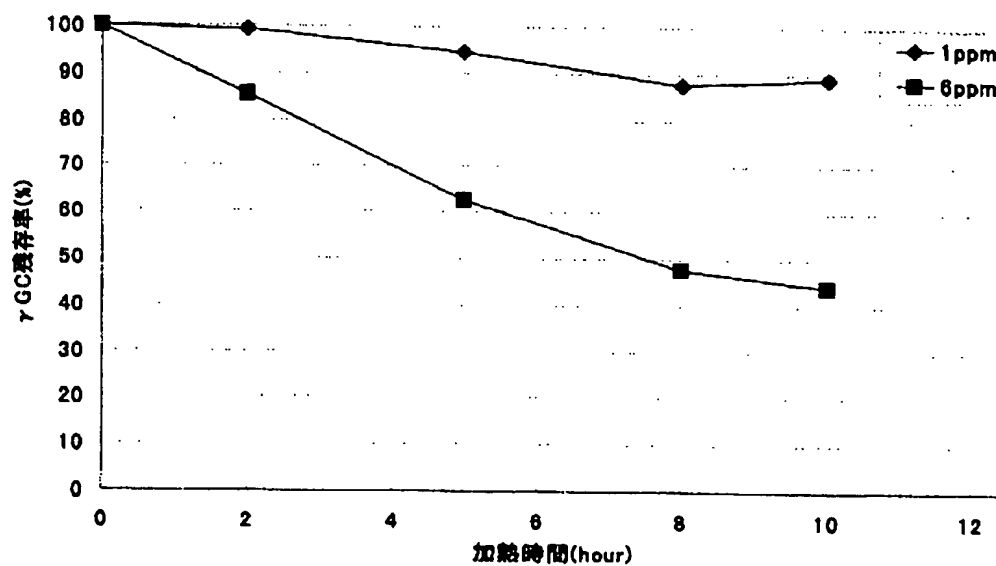


【図 4】

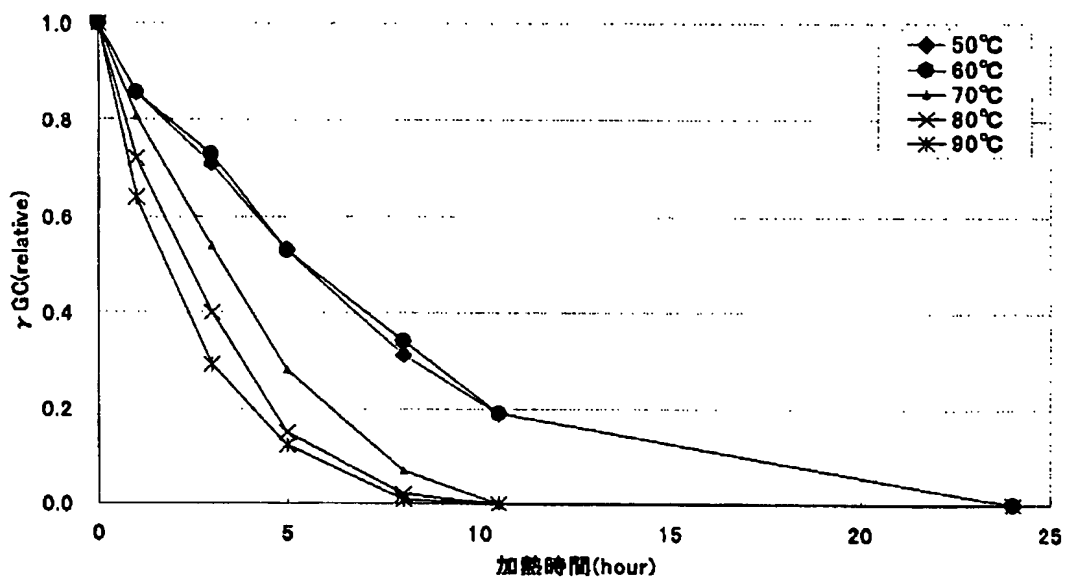
図4 糖存在下でのCys変換率



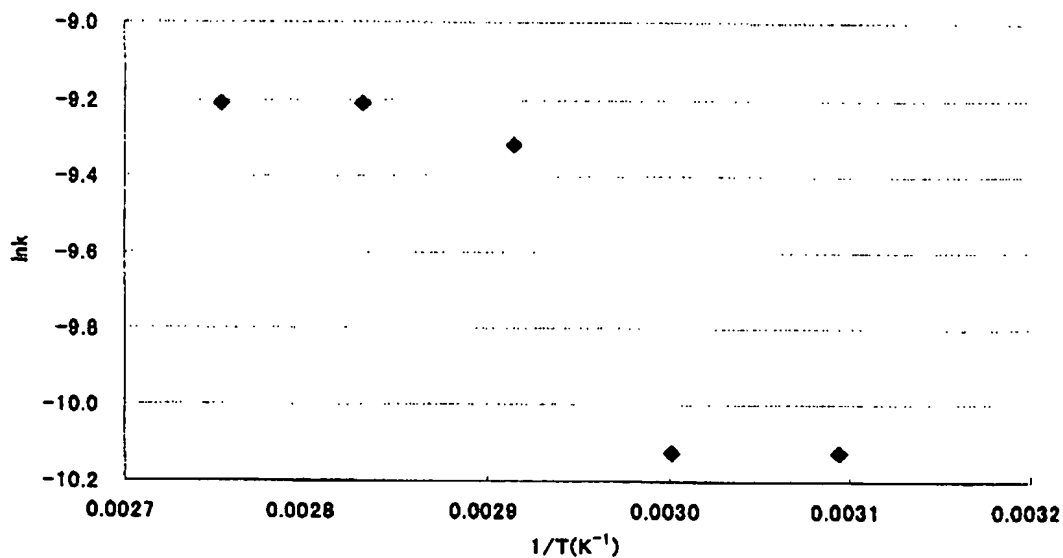
【図 5】

図5 溶存酸素存在下の γ -GC残存率

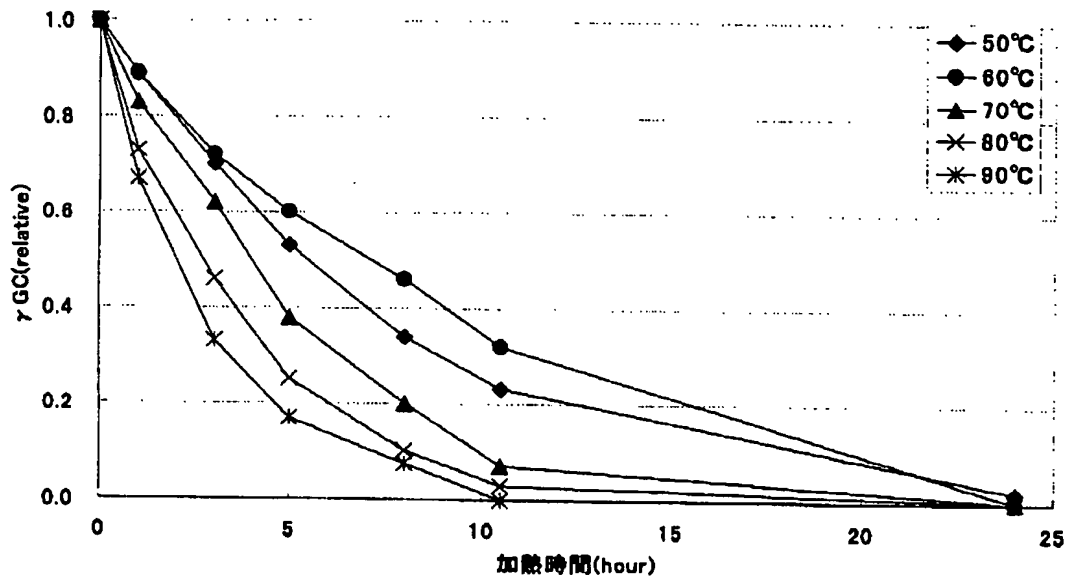
【図 6 A】

図6A DM3%における γ -GCの分解反応(a) DM3%における γ -GC分解経時変化

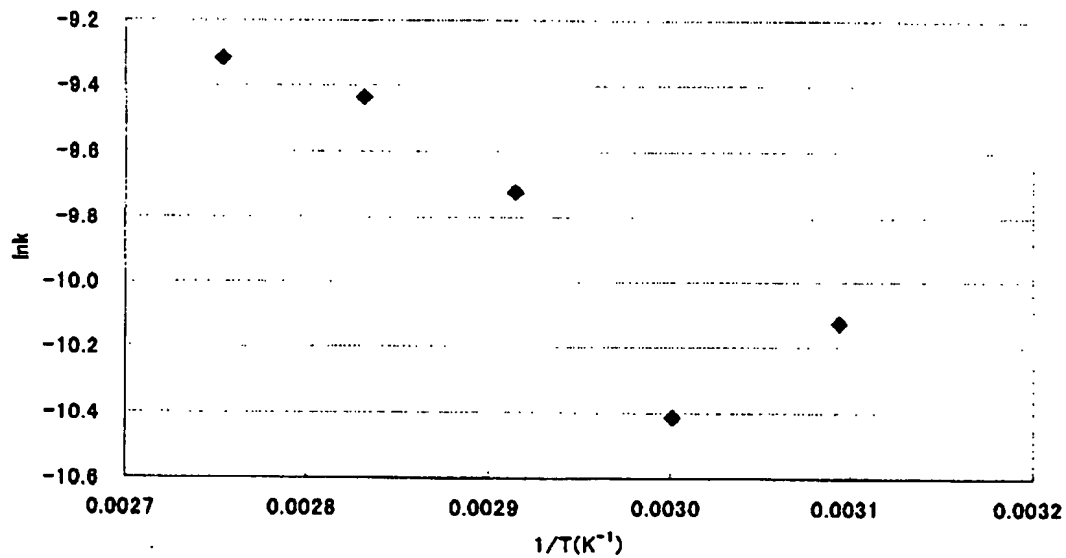
(b) DM3%におけるArrhenius plot



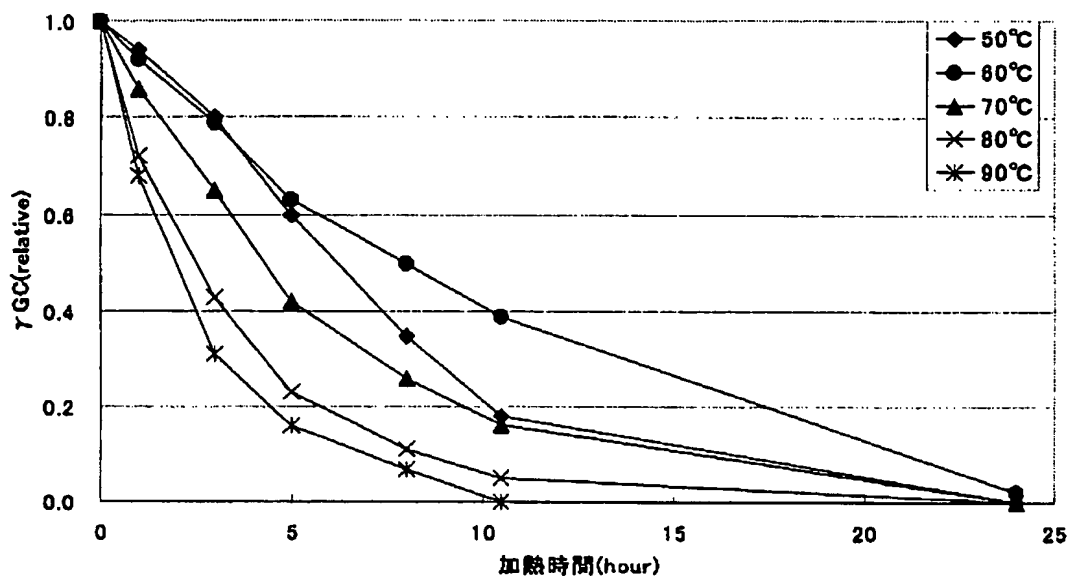
【図 6 B】

図6B DM5%における γ -GCの分解反応(a) DM5%における γ -GC分解経時変化

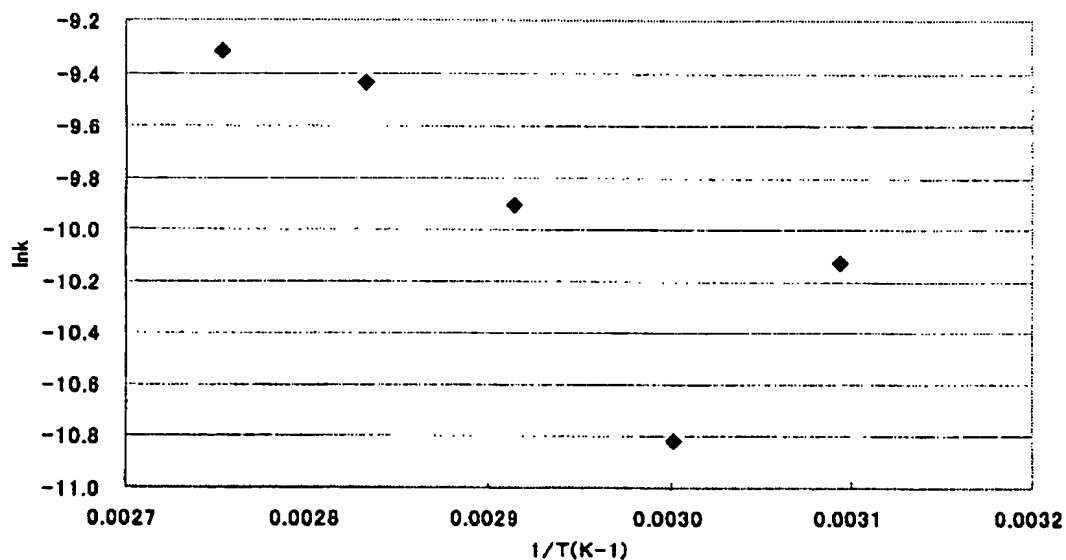
(b) DM5%におけるArrhenius plot



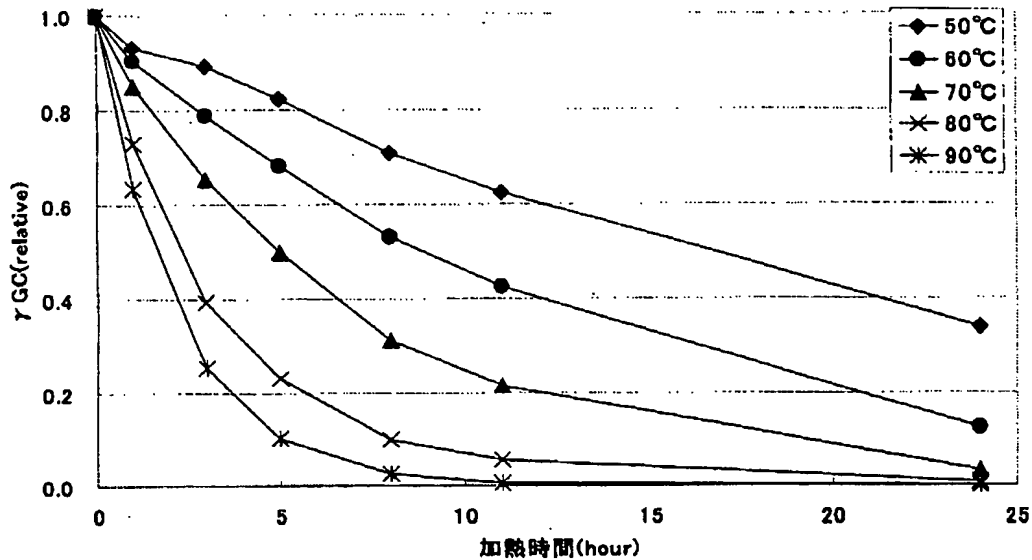
【図 6 C】

図6C DM8%における γ -GCの分解反応(a) DM8%における γ -GC分解経時変化

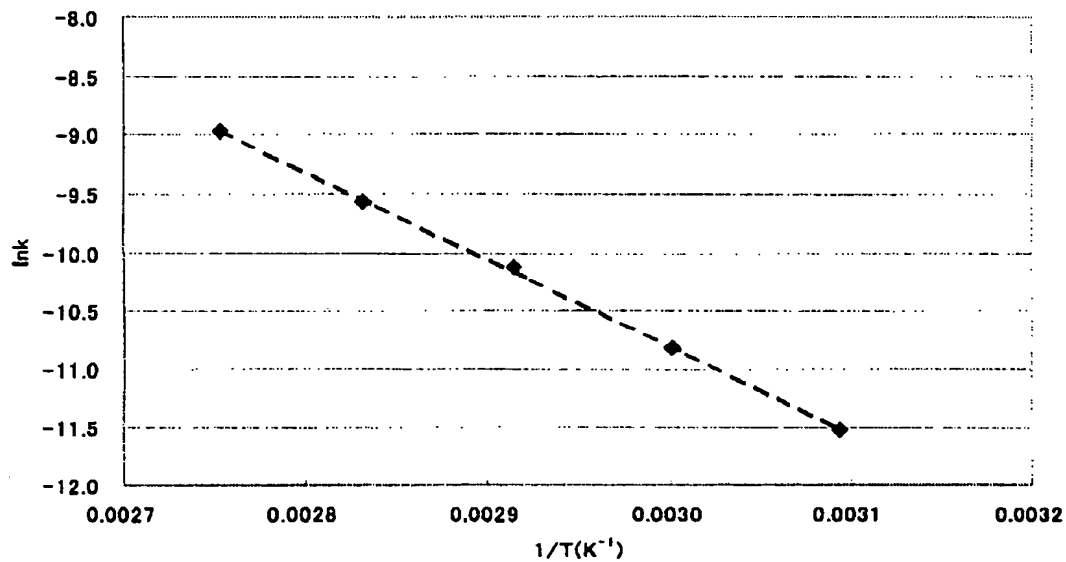
(b) DM8%におけるArrhenius plot



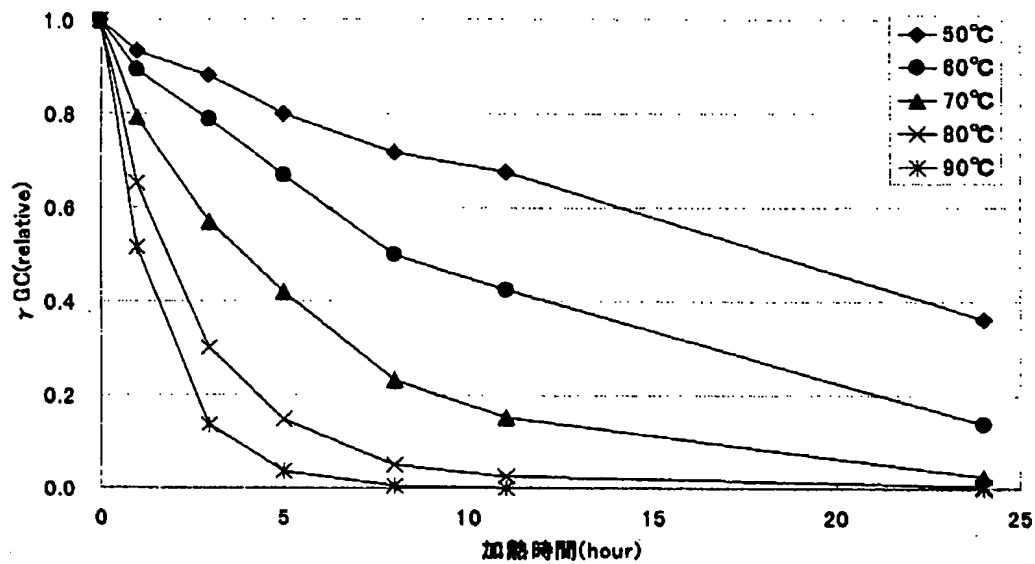
【図 6 D】

図6D DM10%における γ -GCの分解反応(a) DM10%における γ -GC分解経時変化

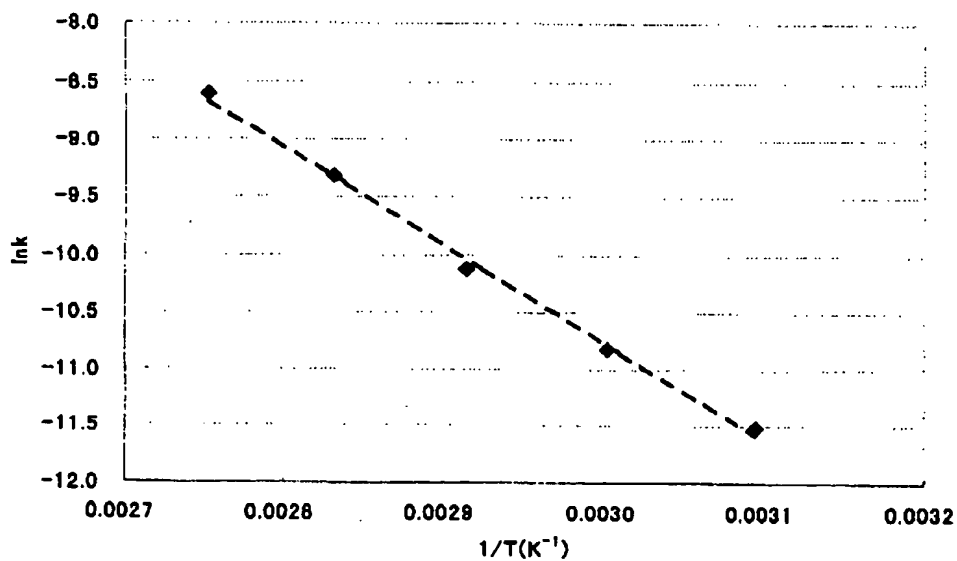
(b) DM10%におけるArrhenius plot



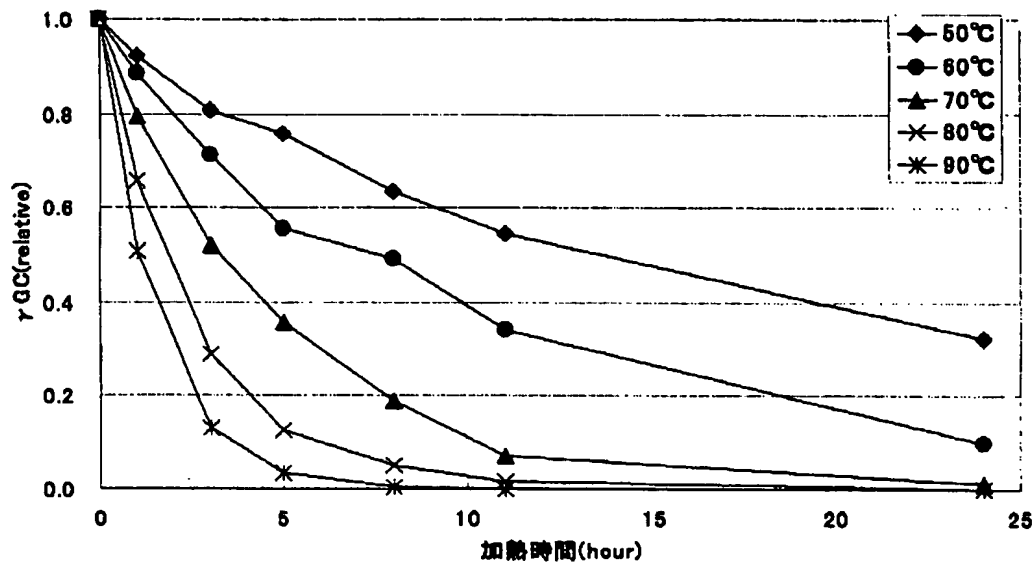
【図 6 E】

図6E DM20%における γ -GCの分解反応(a) DM20%における γ -GC分解経時変化

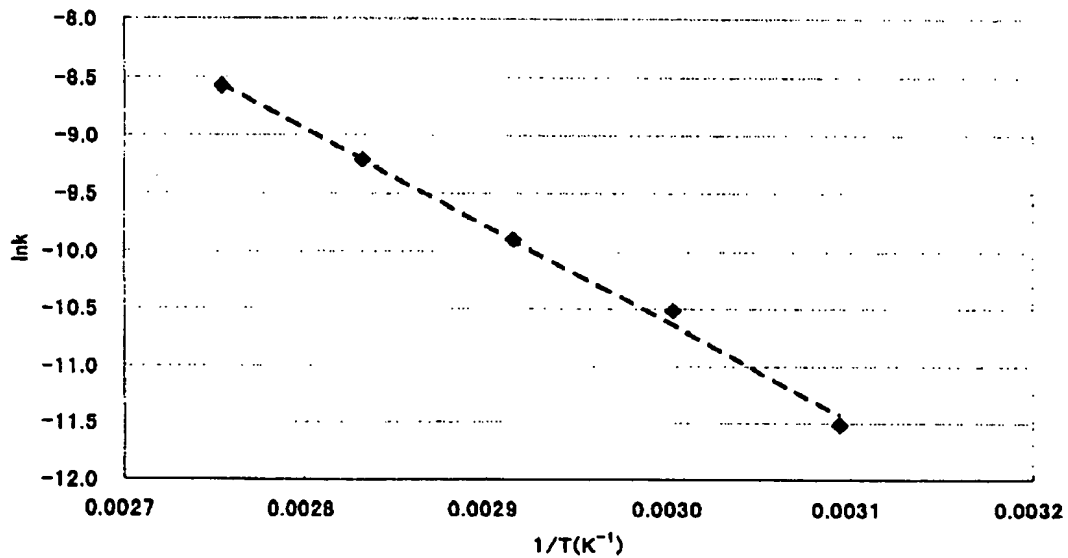
(b) DM20%におけるArrhenius plot



【図 6 F】

図6F DM30%における γ -GCの分解反応(a) DM30%における γ -GC分解経時変化

(b) DM30%におけるArrhenius plot





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 γ -CG から効率的にシステインを得ることができる方法、延いては酵母エキスを製造し、同エキスを 60℃ 以下の低温に制御しながら濃縮して固形分濃度 10% 以上の液体の形態の食品素材を調製し、該食品素材を 70～130℃ に保持することを特徴とするシステイン高含有食品素材の製造法。

【解決手段】 γ -グルタミルシステインを 1 重量% 以上含有する酵母菌体から酵母エキスを製造し、同エキスを 60℃ 以下の低温に制御しながら濃縮して固形分濃度 10% 以上の液体の形態の食品素材を調製し、該食品素材を 70～130℃ に保持することを特徴とするシステイン高含有食品素材の製造法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 6 2 6 6 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 0 0 6 6]

1. 変更年月日

1 9 9 1 年 7 月 2 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区京橋 1 丁目 1 5 番 1 号

氏 名

味の素株式会社